UNTERSUCHUNGEN ZUR SÄURE- UND HITZEPRÄZIPITIERBARKEIT VON FIBRINOGEN UND SEINEN SPALTPRODUKTEN

Walter Liebl

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546818_0065

Aus der I. Frauenklinik und Hebammenschule
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. J. Zander

UNTERSUCHUNGEN zur SÄURE- und HITZEPRÄZIPITIERBARKEIT von FIBRINOGEN und seinen SPALTPRODUKTEN

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter L I E B L

aus

Vachendorf

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Graeff
Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Zander
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 8. 10. 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. Einführung
1.1. Abbau von quervernetztem Fibrin durch Plasmin
1.2. Abbau von Fibrinogen durch Plasmin
1.3. Unterschied zwischen Fibrinolyse und Fibrinogenolyse
1.4. Diagnostische Bedeutung der Fibrin-Fibrinogen-Abbauprodukte FFAP im Serum

2. Fragestellung

3. Methoden und Material
3.1.1. Herstellung der Fibrinogenabbauprodukte
3.1.2. Herstellung der Fibrinabbauprodukte
3.2. Plasma und Serum von gesunden Personen
3.3. Fällungsmethoden von FFAP
3.3.1. Thrombinfällung
3.3.2. Hitzefällung
3.3.3. Säurefällung
3.3.4. Säure-Hitze-Fällung
3.4. Lösen der Präzipitate
3.5. Konzentrationsbestimmung von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten
3.6. Staphylokokken-Clumping-Test
3.7. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
3.8. Reduzieren der Proben

4. Ergebnisse
4.1. Verschiedene Fällungsmethoden von Fragment X und anschließende PAA-Gel-Elektrophorese
4.2. Hitzepräzipitation der Fragmente X, Y, D
4.2.1. Aus reinen Lösungen
4.2.2. In Gegenwart von Serum bzw. Plasma
4.3. Säurepräzipitation im pH-Optimum
4.3.1. Von Normalserum
4.3.2. Von Fibrinogenspaltprodukten in Gegenwart von Normalserum
4.4. Säure-Hitze-Präzipitation
4.4.1. pH-Optimum bei der Säure-Hitze-Fällung
4.4.2. Säure-Hitze-Präzipitation von FFAP in Gegenwart von Normalserum
4.4.3. Empfindlichkeit der Säure-Hitze-Fällungsmethode

5. Diskussion
6. Zusammenfassung

1. Einführung

1.1. Abbau von quervernetztem Fibrin durch Plasmin

An den komplizierten Vorgang der Blutgerinnung schließt sich die langsame Auflösung des Gerinnsels durch das fibrinolytische System an. Unter Blutgerinnung versteht man die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin unter Einwirkung der Endopeptidase Thrombin. Fibrinogen ist ein längliches Protein mit dem Molekulargewicht 340 000, das sich aus zwei identischen Untereinheiten mit je 3 Polypeptidketten zusammensetzt 2 ($A\alpha$, $B\beta$, γ) (4,5,6,8,14). Thrombin spaltet zunächst das Peptid A und im weiteren Verlauf das Peptid B ab, wodurch ein Fibrinmonomer entsteht. Nun erfolgt die eigentliche Gerinnselbildung. Dabei entstehen Fibrinmonomeraggregate, die noch in 4 - 8M Harnstofflösung löslich sind. Erst durch Wirkung des Fibrin stabilisierenden Faktors FSF, der durch Thrombin aktiviert wird, wird dem Fibrin-Polymer die notwendige Festigkeit verliehen, um in Harnstoff unlöslich zu sein (25).

$$\text{Fibrinogen } (A\alpha, B\beta, \gamma)\ 2 \xrightarrow{\text{Thrombin}} \text{Fibrin-Monomer} + \text{Peptide A + B } (\alpha, \beta, \gamma)\ 2$$

$$\left.\begin{matrix}\text{Fibrinmonomere}\\ \text{Fibrinogen}\end{matrix}\right\} \longrightarrow \text{Fibrin-Polymere } (\alpha_2\ \beta_2, \gamma_2)_p$$
$$\left.\begin{matrix}\text{Fibrinmonomere}\\ \text{Fibrinogen}\end{matrix}\right\} \longrightarrow \text{LFMK } (\alpha_2, \beta_2, \gamma_2)\ 2$$

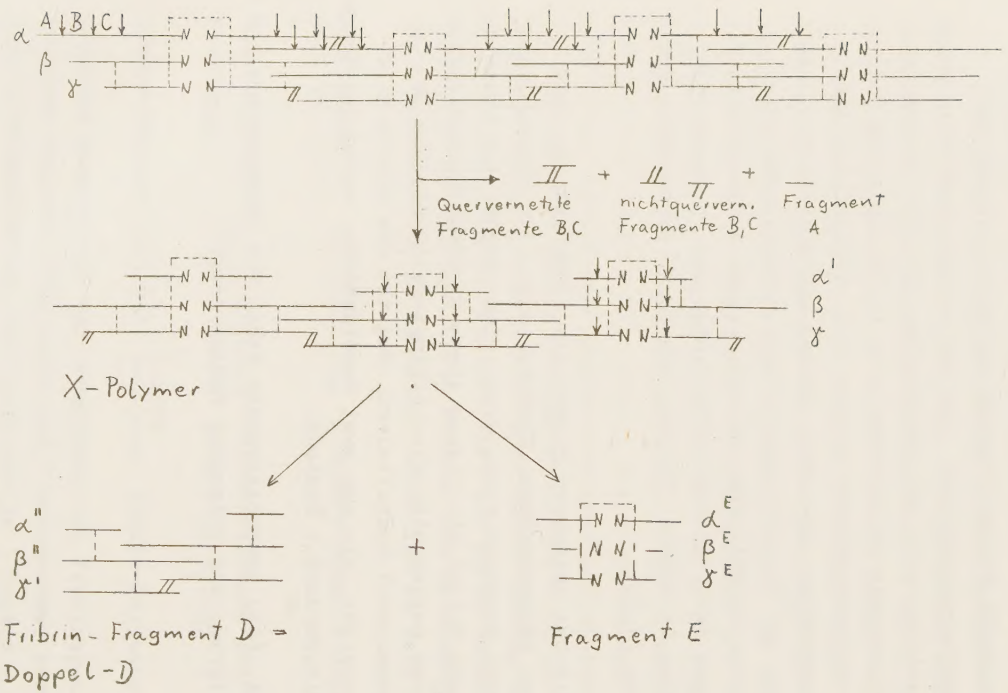
$$\text{Fibrin-Polymer (löslich)} \xrightarrow{\text{F XIII}} \text{Fibrin-Polymere (unlöslich)}$$

Außerdem konnten bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin Komplexe zwischen Fibrinogen und Fibrinmonomer oder zwischen zwei Fibrinmonomeren, die beide nur je 1 Peptid A verloren haben, beobachtet werden (21,22,26). Diese löslichen Fibrinmonomerkomplexe (LFMK) sind in Anwesenheit von Harnstoff dissoziierbar.

Die Verdauung des nunmehr entstandenen Fibringerinnsels erfolgt durch das als Endopeptidase wirkende Enzymprotein Plasmin. Auch hier wird Plasmin aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen gebildet. Die Aktivierung kann über zahlreiche physiologische und pharmakologische Aktivatoren erfolgen. Bluteigene Aktivatoren sind in Thrombozyten und Erythrozyten nachgewiesen worden. Auch Tränenflüssigkeit, Urin, Fruchtwasser, Speichel, Sperma und Muttermilch, die als Sekrete und Körperflüssigkeiten abschlußgefährdete Röhrensysteme durchfließen müssen, weisen Aktivatoren auf. Gewebseigene Aktivierungsstoffe findet man in hohen Konzentrationen in Uterus, Lungen, Prostata, Nebennieren und Lymphknoten (1,2).

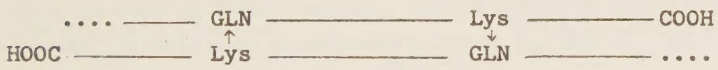
Therapeutisches Interesse findet die Streptokinase, ein Produkt von Streptokokken. Streptokinase, ein Protein ohne enzymatische Eigenschaften, wirkt nicht direkt auf Plasminogen, sondern bildet mit diesem einen Streptokinase-Plasmin-Komplex, der seinerseits eine Arginyl-Valin-Bindung im Plasminogenmolekül hydrolisiert. Nun ist die aktive Molekülform erreicht, die aus zwei Peptidketten, verbunden durch eine Disulfidbrücke, besteht.

Pizzo et al. (42) beschreiben den Abbau von hochquervernetztem Fibrin, wie folgendes Modell zeigt:



Schematische Darstellung des Abbaus von quervernetztem Fibrin durch Plasmin

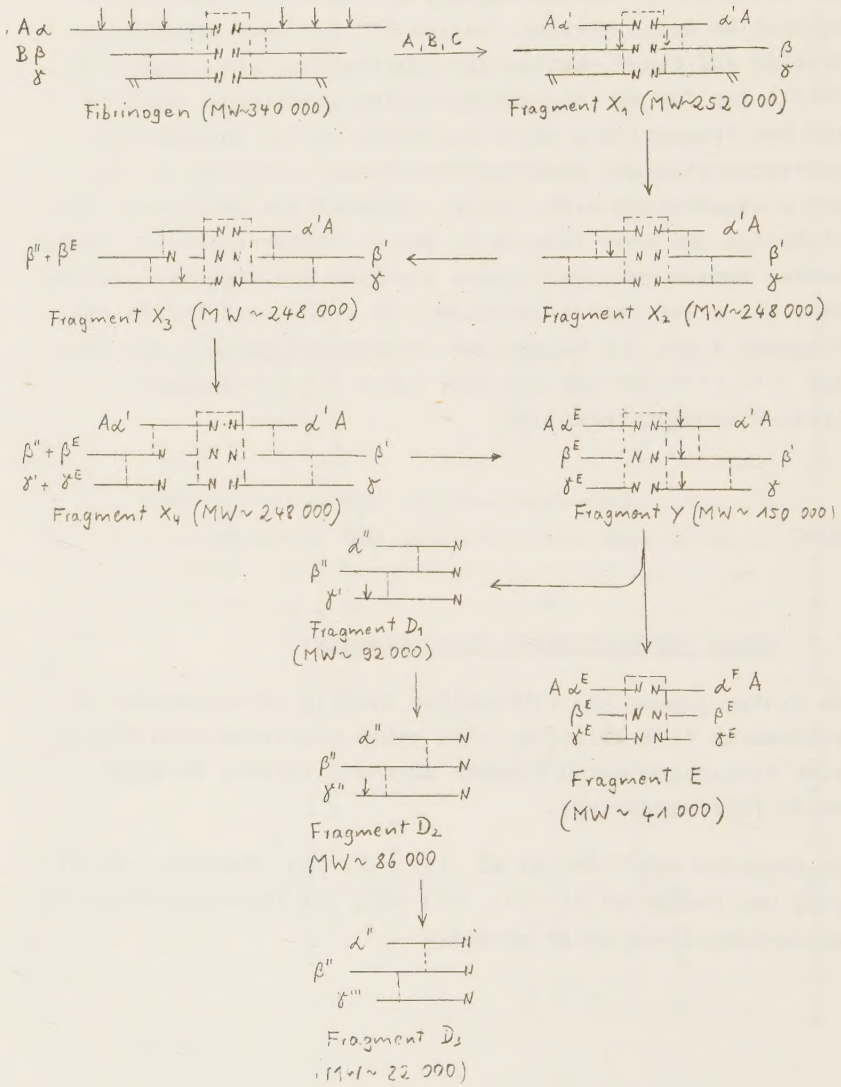
Der Abbau durch Plasmin beginnt im quervernetzten Fibrinmolekül an den α -Ketten. Da der Ort der Quervernetzungsstellen auf den α -Ketten nur hypothetisch ist, zeigt das Modell den für am wahrscheinlichsten gehaltenen, nämlich auf den Fragmenten B und C und nicht auf A. Nachdem die quervernetzten und nichtquervernetzten α -Petide A, B und C abgespalten sind, bleibt zunächst ein X-Polymer, das α'-Ketten und noch intakte ß- und γ -Ketten aufweist. Diese Ketten werden nun vom Plasmin ziemlich gleichschnell in der Nähe der N-Terminalen gespalten. Es resultiert daraus ein Fragment E und ein "Doppel-D". Dieses zweifache D ist über das γ'- γ'-Dimer (MW 200 000) durch ε - (γ-Glutamyl) Lysin-Bindungen verknüpft.



1.2. Abbau von Fibrinogen durch Plasmin

Da Blutgerinnung und Fibrinolyse ständig nebeneinander im strömenden Blut ablaufen, wird neben quervernetztem Fibrin auch Fibrinogen durch Plasmin abgebaut. Dieser Vorgang heißt Fibrinogenolyse.

In Arbeiten von Pizzo et al. (37, 38, 39), Ferguson et al. (10) und Furlan et al. (11, 12) wird die Fibrinogenolyse in einem Modell wie folgt gezeigt:



Schematische Darstellung des Abbaus von Fibrinogen durch Plasmin. Die senkrechten Pfeile symbolisieren Plasminspaltungen

Wie beim quervernetzten Fibrin greift Plasmin das Fibrinogenmolekül zuerst an den beiden α -Ketten an, von denen drei kleinere Peptide A, B, C mit dem ungefähren Molekulargewicht von je 15 000 abgespalten werden. Das entstandene Molekül, das sich vom Fibrinogenmolekül nur in den verkürzten α -Ketten unterscheidet, nennt man Fragment X_1 (39). Es ist klar, daß die Abspaltung der einzelnen Peptide, A, B, C unterschiedlich schnell vor sich geht und somit eine Reihe von Zwischenprodukten entstehen. Der Einfachheit halber ist im Modell nur eines der möglichen Fragmente X_1 gezeigt. Nachdem auch von der ß-Kette am N-terminalen Ende ein Peptid (Bß 1 - 42 MW 4 000) abgespalten ist, erscheint eine weitere X-Spezie X_2. Um vom Fragment X zu den Fragmenten Y und D zu gelangen, muß jede der frei Ketten noch einmal getrennt werden. Offensichtlich führt dieser Prozeß zu weiteren Zwischenprodukten X_3 und X_4, die sich in der Molekülgröße kaum unterscheiden.

Sind auf einer Seite die α'-, ß' und γ -Kette gespalten, erscheinen zunächst die Fragmente D und Y. Die γ -Peptidketten vom Spaltprodukt D werden am C-terminalen Ende weiter abgebaut, wobei man mehrere D-Untergruppen bekommt. Dieser Abbau erfolgt aber nur in Abwesenheit von Calcium (23), wobei unterschiedliche D-Fragmente auftreten (s. Abb.2). Der weitere Abbau der α'-, ß'- und γ -Ketten im Y-Fragment führt zu seinem völligen Verschwinden und zum Erscheinen eines weiteren D-Fragments und des Fragments E, das im wesentlichen den plasminresistenten Disulfidknoten darstellt (5).

Durch die zeitlich aufeinanderfolgenden Hydrolysen der einzelnen Ketten im Y-Fragment scheint auch hier eine Heterogenität zu bestehen, ohne daß die Molekülgröße sich ändert. Das Y-Molekül bleibt nämlich so lange in seiner

Grundstruktur erhalten, bis die letzte Kettenspaltung erfolgt ist. In diesem Zusammenhang ist auch das Verhalten des frühen Fibrinogenfragments D_1 interessant, das noch durch Einwirkung von Thrombin und Faktor XIII zu dem Fibrinfragment Doppel-D quervernetzen kann (15, 28). So ist auch die Gerinnbarkeit durch Thrombin beim Fragment X nur auf die frühen Formen (X_1 und X_2) beschränkt. Die späteren X-Fragmente (X_3 und X_4) sind dagegen nicht mehr gerinnbar (10).

1.3. Unterschied zwischen Fibrinolyse und Fibrinogenolyse

Aus der vergleichen Betrachtung der beiden Abbauvorgänge läßt sich ein Unterschied in der Qualität der einzelnen Abbauprodukte erkennen.

Beim Fibrinogenabbau entstehen durch Plasmineinwirkung nach 2 bis 15 Minuten die Fragmente X und Y, während bei nach länger als 60 Minuten dauernden Plasminolyse die Endprodukte A, B, C, D und E auftreten. Die Plasminolyse von quervernetztem Fibrin beginnt mit dem Auftreten von X-Polymer, das aber nur durch Lösen des Clots im Harnstoff faßbar ist, und endet im Erscheinen von Doppel-D und Fragment E. Außerdem unterscheiden sich die Derivate von Fibrin und Fibrinogen um die Fibrinopeptide A und B, die bei der Fibrinbildung gespalten werden. Die Molekulargewichtsverminderung von 2 000 - 3 000 je Peptid fällt bezüglich der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit kaum ins Gewicht (27,38).

1.4. Diagnostische Bedeutung der Fibrin-Fibrinogen-Abbauprodukte (FFAP) im Serum

Die fibrinolytische Aktivität im Serum oder Plasma kann über die Globaltests, d.h. Spontanlyse eines Gerinnsels, Euglobulin-Lyse-Zeit (16), und über die einzelnen Fraktionen-

Tests bestimmt werden. Natürlich geben auch die Serumspiegel der einzelnen Spaltprodukte Aufschluß über hyperfibrinolytische Zustände. Bei Normalpersonen wurden FFAP-Konzentrationen unter 10 ug ml Serum gefunden (9, 37). Dabei konnte weder ein Unterschied im Geschlecht noch während des Menstrualzyklus festgestellt werden. Jedoch zeigte sich nach verschiedenen körperlichen Übungen sowie nach Adrenalininfusion ein Anstieg der FFAP-Serum-Konzentration.

Hedner und Nilson (19) stellten in einer klinischen Studie pathologische FFAP-Konzentrationen bei Karzinomen, chronischen und akuten Nephropathien, septischem Schock, postoperativen Blutungen, Thromboembolien, Geburts- und Schwangerschaftskomplikationen und nicht zuletzt bei fibrinolytischer Therapie fest.

Besondere Bedeutung findet das Syndrom der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIG), das durch Auftreten von fibrinreichen intravaskulären Gerinnseln in Arteriolen, Kapillaren und Venolen in zahlreichen Organen lebensbedrohliche Zustände hervorruft. Dabei kommt es durch den hohen Verbrauch von Fibrinogen zu einem Abfall der Fibrinogenkonzentration. Ferner werden wegen des generalisierten Gerinnungsvorgangs Thrombozyten und die Gerinnungsfaktoren Y und VIII im strömenden Blut verbraucht. Deshalb spricht man auch von einer Verbrauchskoagulopathie. Das Krankheitsbild ist außerdem durch Schock und durch eine hämorrhagische Diathese gekennzeichnet. Die Pathogenese dieser Gerinnungsstörung beruht in den meisten Fällen auf einer reaktiven Hyperfibrinolyse (29) verursacht durch die intravaskuläre Gerinnung.

Während bei der Verbrauchskoagulopathie die fibrinolytische Aktivität nicht ausreicht, um ein Ausfallen von Fibrin in der kapillaren Endstrombahn zu verhindern, versteht man unter Hyperkoagulabulität einen erhöhten Fibrinogenspiegel und -umsatz, eine erhöhte Gerinnungsaktivität als Ausdruck von erhöhten LFMK-Spiegeln bei gleichzeitig herabgesetzter fibrinolytischer Aktivität (17, 24) und verminderten Antithrombin III-Spiegeln (29).

Jede Schwangerschaft geht Hand in Hand mit einer Hyperkoagulabilität, was das Risiko für Thrombosen, Lungenembolien und disseminierte intravaskuläre Gerinnungsvorgänge erhöht.

Das Problem, die Hyperkoagulabilität von der manifesten intravaskulären Gerinnung abzugrenzen, rückte in den letzten Jahren in den Vordergrund des Interesses. Die Darstellung und Charakterisierung von Umsatzprodukten des Fibrins einerseits sowie des Fibrinogens andererseits, sind von besonderer Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese und die sich hieraus ergebende Therapie der Fibrinogenstoffwechselstörungen. In Anbetracht des komplizierten Molekülaufbaus von Fibrinogen bzw. Fibrin ergeben sich bezüglich der quantitativen und qualitativen Bestimmung der FFAP manche Probleme. Die immunologischen Bestimmungsmethoden erlauben zum Beispiel keine Differenzierung zwischen Derivaten von Fibrin und Fibrinogen.

Eine brauchbare Methode bietet sich in der Darstellung der FFAP mittels der PAA-Gel-Elektrophorese. Die Schwierigkeiten hierbei ergeben sich in der Isolierung der FFAP aus dem Serum. Lane et al. (34) konnten FFAPs aus Serum mit einer I$_{m}$munpräzipitationsmethode isolieren und anschließend in der PAA-Gel-Elektrophorese darstellen und bestimmen.
Im Gerinnungslabor Prof. Graeff wurde diese Methode zwar erfolgreich angewendet, aber es zeigte sich auch, daß dieses Verfahren langwierig ist und nicht immer zu eindeutigen Befunden führt.

2. Fragestellung

In Anbetracht der Ergebnisse, die Hafter, v. Hugo, Graeff in ihrer Arbeit über Säurepräzipitation von Fibrinogen erzielt hatten, war es nun von Interesse, eine einfache Abscheidungsmethode für die bei der Plasminolyse entstehenden Fibrinogen- sowie Fibrinabbauprodukte zu entwickeln. Folgende Kriterien sollte die Methode erfüllen:

a) Möglichst alle Spaltprodukte sollten auf einmal erfaßt werden.
b) Die präzipitierten Abbauprodukte sollten in einer PAA-Disk-Elektrophorese darstellbar sein.
c) Die hochmolekularen Fibrinogen-Derivate sollten neben allen Serumproteinen spezifisch präzipitieren.
d) Die Methode sollte einfach und schnell durchführbar sein.
e) Sie sollte nicht zuletzt auf geringste Konzentrationen wie 10 ug/ml Spaltprodukte ansprechen.

3. Methoden und Material

3.1.1. Herstellung der Fibrinogenabbauprodukte

Gefriergetrocknetes Human-Fibrinogen (FFBH Deutsche Kabi München) wurde in destilliertem Wasser zu einer Stammlösung von 8 mg/ml gelöst.
Proben dieser reinen Fibrinogenlösung wurden durch Aktivierung von Plasminogen abgebaut. Plasminogen ist als Verunreinigung neben dem Fibrinogen vorhanden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 120 I.E. Test-Streptokinase (Behringwerke) zu 2 ml (≙ 16 mg Fibrinogen) gestartet. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C (2', 10', 20', 30', 60' 240') wurde der Abbauvorgang mit 52 mg (0,2 mg/ml) ε-Aminocapronsäure + 1000 KIE (0,1 ml) Trasylol (Bayer, Leverkusen) gestoppt.

3.1.2. Herstellung der Fibrinabbauprodukte

1 ml Citrat-Normalplasma (1:9; ohne Trasylol) wurde rasch nacheinander mit 160 I.E. Streptokinase (= 0,08 ml) und 3 I.E. Test-Thrombin (= 0,1 ml), (Behringwerke Marburg) + 0,1 ml $CaCl_2$ (= 5,5 mg) inkubiert. Dabei bildete sich innerhalb einer Minute ein Clot, der nach 3 Minuten wieder vollständig gelöst war. Nach 12 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion mit 1000 KIE Trasylol gestoppt.

3.2. Plasma und Serum von gesunden Personen

Plasma wurde aus frischem Blut von gesunden Personen gewonnen. 9 ml wurden in Gegenwart von 1 ml Antikoagulanz aus der Kubitalvene mit einer 10 ml Einmalspritze und einer Einmalkanüle Nr. 1 entnommen. Der zelluläre Anteil wurde durch 5minütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min (= 1200 x g) vom Plasma getrennt. Durch nochmaliges Zentrifugieren bei 5000 U/min (= 2000 x g) wurde eine noch stärkere Klärung erreicht.
Die Antikoagulanzlösung bestand aus:

0,129 M tri-Natriumcitrat
0,06 M TES (= Tris-/hydroxymethyl/-methyl-2-aminoäthansulfonsäure)
10 ml Trasylol = 100 000 KIE
aqua bidest. ad. 100 ml, pH 7.4

1 ml des gewonnenen Normalplasmas wurde mit 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt und mit 6 I.E. Thrombin (0,2 ml) 2 Stunden inkubiert. Das entstandene Fibringerinnsel wurde mit einem Glashäkchen entnommen. Zurück blieb das gewünschte Serum.

3.3. Fällungsmethoden von FFAP

3.3.1. Thrombinfällung

Je 0,5 ml eines Plasminabbaugemisches wurde mit 2,5 ml Phosphatpuffer (pH 6,35) verdünnt, danach mit 0,2 ml Thrombin 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Gerinnsel wurde mit einem Glashäkchen entnommen, auf einem Filterpapier ausgedrückt und zweimal in Saline gewaschen.

3.3.2. Hitzefällung

0,5 ml einer Probe wurden mit 2,5 ml Saline diluiert und anschließend im Wasserbad 10 Minuten bei 60°C erhitzt. Das Verdünnungsverhältnis 1:5 wurde stets eingehalten.

3.3.3. Säurefällung

Bei Abbaugemischen aus reinen Lösungen wurde nach der Säurepräzipitationsmethode nach Hafter et al. (20) verfahren. Dabei wurden die Proben mit Tris-NaCl-Puffer pH 3,4 verdünnt. Um das pH-Optimum der Säurepräzipitation von FFAP in Gegenwart von Serum festzustellen, wurden jeweils 0,5 ml-Proben auf 5,0 ml mit Aqua dest aufgefüllt und mit N/10 HCL pH-Werte von 3,8 - 7,0 eingestellt. Im Eisbad ($\sim$ 4°C) wurde die Präzipitation abgewartet. Beste Ausbeuten wurden nach ca. 20stündigem Stehen bei 4°C erhalten.
Der Tris-NaCl-Citrat-Puffer, pH 7,6, Ionenstärkte u = 0,24 enthielt in 1 l:

6,05 g Tris (hydroxymethyl)aminomethan (0,05 M)
6,76 g NaCl (0,116 M)
3,8 g tri-Na-Citrat. 2 H_2O (0,0129 M)
3,3 g ε-Aminocapronsäure (0,025 M)
eingestellt auf pH 3,4 mit HCl.

3.3.4. Säure-Hitze-Fällung

Jede Probe wurde mit Saline im Verhältnis 1:5 verdünnt. Nach Einstellen des pH auf 5,6 erhitzte man jeweils 10 Minuten auf 60°C.

3.4. Lösen der Präzipitate

Die mit den soeben beschriebenen Methoden erhaltenen Präzipitate wurden 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert, und durch Abpipettieren vom Überstand befreit. (Die 60 Minuten Abbaugemische sedimentieren erst vollständig nach 30minütigem Zentrifugieren). Danach wurde zweimal in 3 ml H_2O gewaschen und je nach Menge des Niederschlags in 0,5 ml oder 1,0 ml TES-Puffer, mit Harnstoff gesättigt, gelöst.

Der TES-Citrat-Puffer pH 7,5 enthielt:

0,06 M TES
0,08 M NaCl
0,0129 M tri-Na-Citrat
0,025 % Na Azid
100 KIE Trasylol/ml

} mit Harnstoffkristallen gesättigt

Der Lösungsvorgang der Säure-Hitze-Präzipitate dauert oft bis 24 Stunden. Dagegen lösen sich die Präzipitate rasch, wenn ein Tropfen Ammoniaklösung ($\sim$ 10 ul) zugesetzt wird.

3.5. Konzentrationsbestimmung von Fibrinogen und seinen Spaltprodukten

Da sich die Präzipitate aus den oben beschriebenen Fällungsmethoden in TES-Puffer + Harnstoff lösen, können die Konzentrationen der Lösungen photometrisch nach Blombäck und Blombäck (1956) bestimmt werden.

0,1 ml der Lösung wurde mit 5 ml H_2O verdünnt und die optische Dichte bei 280 nm und 325 nm gegen Wasser gemessen. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$mg\ Fg/ml = (A_{280} - A_{325}) \cdot 0{,}629 \cdot 51 \qquad (25)$$

Der Faktor 0,629 errechnete sich aus dem Extinktionskoeffizienten für Fibrinogen in Alkali von 15,87. Der Verdünnungsfaktor ist in diesem Fall 51 (0,1 ml + 5 ml).

3.6. Staphylokokken-Clumping-Test (SCT)

Der Staphylokokken-Clumping-Test ist eine besonders einfache Methode um FFAP im Serum nachzuweisen. In meinem Fall war es mehr von Bedeutung, die Präzipitate als FFAP zu identifzieren. Der SCT wurde meist vor der elektrophoretischen Auftrennung durchgeführt und diente somit als Vortest.

Der Test beruht auf einer Agglutination von frühen FFAP (X) mit Staphylokokken. Mittels einer Verdünnungsreihe kann die Konzentrationen annähernd bestimmt werden, nähere Erläuterungen findet man in (45).

3.7. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die PAGE erlaubt eine Auftrennung von Polypeptiden nach Molekulargewicht und Größe.

Da die verschiedenen Proteinmoleküle unterschiedliche Ladungen tragen, würden diese das Wanderungsverhalten im Gel verfälschen.

Das Detergenz Sodium-Dodecyl-Sulfat bildet mit den Polypeptidketten einen Komplex. Auf jedes SDS-Molekül kommen annähernd zwei Aminosäuren. Dieses hohe Maß an komplexgebundenen SDS-Molekülen überdeckt praktisch die Ladungsverteilung der meisten Proteine, und man erhält eine ungefähr gleichmäßige negative Ladung pro Masseinheit.

Dieses konstante Verhältnis zwischen Ladung und Masse bedingt auch ein konstantes Verhältnis zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Molekulargewicht.
Nach einer elektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemisches werden die dafür verwendeten Rundgele mit Coomassie-Brilliant-Blue in Trichloressigsäure gefärbt, wobei die im Gel enthaltenen Proteine fixiert und angefärbt werden. Entfärbt wird dann mit 7 %iger Essigsäure. Die Identifizierung erfolgt durch Vergleich mit Referenzsubstanzen.
Auf die technischen Details wird hier nicht näher eingegangen (41).

3.8. Reduzieren der Proben

Zur Kettencharakterisierung des Fibrinogens und seiner Derivate müssen die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten gelöst werden. Dies geschieht durch Zugabe von 0,02 ml Mercaptoäthanol (MCA) auf je 0,5 ml einer mit Harnstoff gesättigten Lösung. Nach ca. 1 Stunde sind alle Disulfidbrücken reduziert.

4. Ergebnisse

4.1. Verschiedene Fällungsmethoden von Fragment X und anschließende PAA-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Um hauptsächlich Fragment X zu erhalten, wurde Fibrinogen (Kabi) 2 Minuten lang durch Plasmin abgebaut. Dieses Abbaugemisch wurde der Hitze-, der Säure- sowie der Thrombinfällung unterzogen. (Abb. 1)

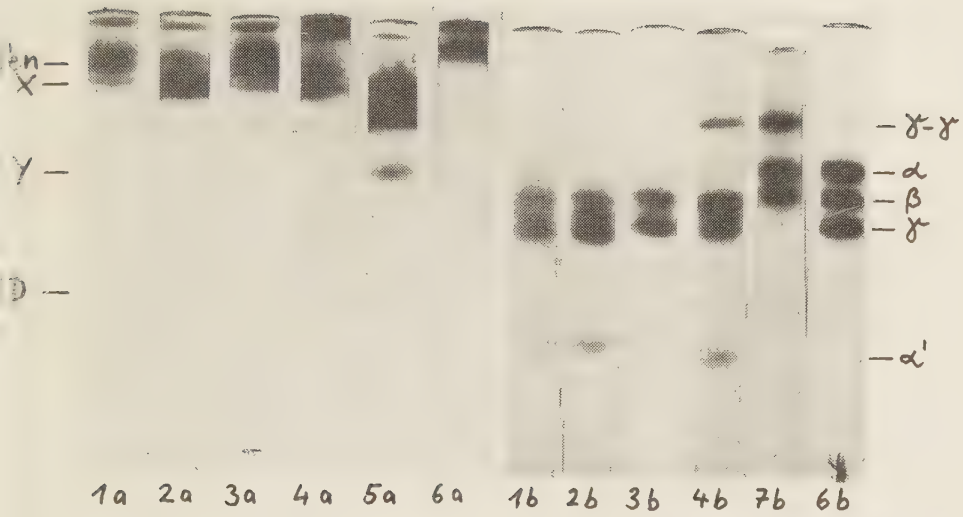


Abb. 1

SDS-PAGE von 2 Min. Abbau von Fibrinogen (Fragment X)

1a, 1b: nach Fällen durch Erhitzen (10', 60°C)
2a, 2b: nach Fällen durch Ansäuern
3a, 3b: nach Fällen durch Thrombin
4a, 4b: nach Fällen durch Thrombin (teilweise quervernetzt)

Referenzen:
5a: 5 Min. Abbau von Fibrinogen
6a, 6b: Fibrinogen
7b: quervernetztes Fibrin

a: nichtreduzierte Proben, 5 % Gel
b: reduzierte Proben, 7,5 % Gel

Fragment X war in allen Fällen präzipitierbar. Die Gele 1 + 3 zeigen, daß die Hitze- und Thrombinfällung mehr die frühen X-Komponenten erfaßt, während bei der Säuremethode auch die späteren X in Erscheinung treten.
Bei Aktivierung von F XIII wird das Fibrinogen-Fragment X mit Thrombin auch teilweise quervernetzt zur Gerinnung gebracht (Gel 4a und 4b). Die reduzierten Proben zeigen das Vorliegen der Kettenuntereinheiten ß, ß', γ und α'. Bei der mit Thrombin gewonnenen Probe (4b) trat zusätzlich die γ - γ Kette als Ausdruck einer teilweisen Quervernetzung auf.

Die Ausbeutenbestimmung durch photometrische Messung der Überstände aus den verschiedenen Fällungen ergab, daß bei der Hitzefällung 79 % des eingesetzten Fibrinogens ausfielen. Da das MW des X-Fragments 75 % des Fibrinogenmoleküls beträgt, war die Abscheidung von X 100%ig (350 000 : 255 000 = 100 : 75 = Fg : X). Aus der Thrombinfällung konnte eine 93 %ige Ausbeute von X errechnet werden. Die Säuremethode brachte 79 % von X zur Präzipitation. Die Ausbeuten erhöhten sich jedoch noch, wenn die entsprechenden Ansätze über Nacht im Kühlraum bei 4°C standen .

Tab. 1

Ausbeute an FAP aus reinen Lösungen nach verschiedenen Fällungsmethoden

	Antl.v.Fg in %	Ausbeute von X in %
Hitzefällung (10', 60°)	79	100
Säurefällung (Tris-Puffer, pH 3,4)	59	79
Thrombinfällung	70	93

4.2. Hitzepräzipitation der Fragmente X, Y, D

4.2.1. Aus reinen Lösungen

20 Minuten- und 60 Minuten-Plasminabbaugemische wurden 5 Minuten bei 60°C erhitzt und die Niederschläge elektrophoretisch untersucht (Abb. 2). Dabei war festzustellen, daß die Fragmente X, Y, D prinzipiell in der Hitze ausfallen. Im Vergleich mit den Referenzen war im Bandenmuster kein Unterschied zu registrieren, jedoch waren die Ausbeuten schlecht. Nach weiterem Erhitzen des Überstands präzipitierte ein weiterer Teil (Gel 5). Fragment E (Gel 4), das in der Referenz sichtbar ist, war nicht hitzefällbar (Gel 3). Nachdem man die Abbaugemische vor dem Erhitzen mit zwei Tropfen 1 N HCl angesäuert hatte, wurden deutlich bessere Ausbeuten erzielt (Gel 6 und 7).

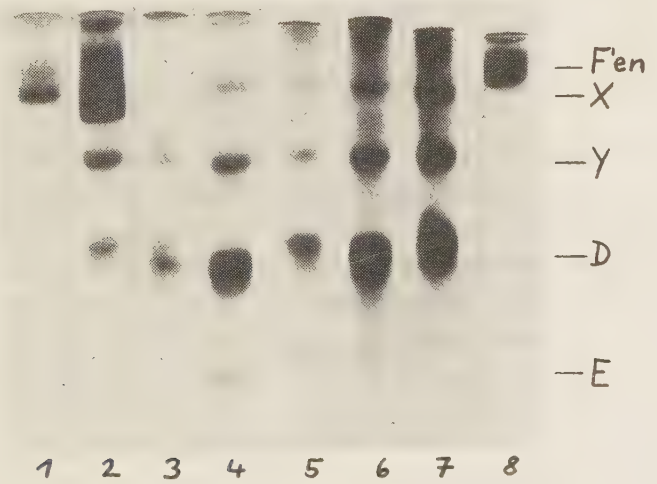


Abb. 2

SDS-PAGE von 20 Min. und 60 Min. Abbau von Fibrinogen nach Hitzepräzipitation (5 % Gel)

1 : 20' Abbau, 5' auf 60°C erhitzt
2 : 20' Abbau, nicht erhitzt (Referenz)
3 : 60' Abbau, 5' auf 60°C erhitzt
4 : 60' Abbau, nicht erhitzt (Referenz)
5 : eine Hälfte des Überstandes von Nr. erneut 5' auf 60°C erhitzt
6 : zweite Hälfte des Überstandes von Nr. 3 auf pH 5,5 angesäuert
7 : 60' Abbau, 5' auf 60°C erhitzt, dann angesäuert (pH 5,5)
8 : Referenz: Fibrinogen

4.2.2. In Gegenwart von Serum bzw. Plasma

Die Fibrinogenabbaufragmente konnten bei Anwesenheit von Serum in der Hitze nur schlecht präzipitiert werden. In Gegenwart von Plasma wurden in der Elektrophorese sogar nur eine schwache Bande von Fibrinogen und eine Albuminbande sichtbar. Selbst bei Konzentrationen von 200 mg% FAP der in vitro hergestellten Gemische aus Serum und Abbaugemisch blieben die durch Hitzepräzipitation erzielten Ergebnisse unbefriedigend.

4.3. Säurepräzipitation im pH-Optimum

4.3.1. Von Normalserum

Vorversuche , FAP in Gegenwart von Serum durch Ansäuern abzuscheiden, zeigten , daß sich im Normalserum bereits ohne FAP-Zusatz im pH-Bereich von 4,5 bis 6,0 ein Niederschlag bildet (Abb. 3).

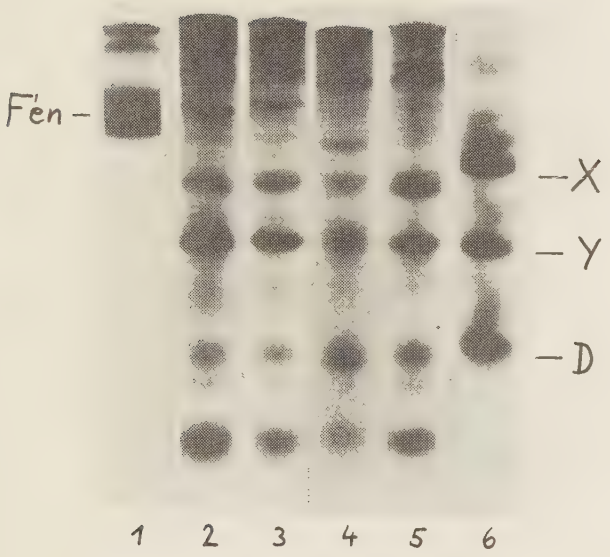


Abb. 3

SDS-PAGE von Säurepräzipitat aus Normalserum (5 % Gel)

1 : Referenz: Fibrinogen
2 : Normalserum : pH 5,8 (ohne Erhitzen)
3 : Normalserum : pH 5,5 (ohne Erhitzen)
4 : Normalserum : pH 5,0 (ohne Erhitzen)
5 : Normalserum : pH 4,5 (ohne Erhitzen)
6 : Referenz: 30' Abbau von Fibrinogen

In der Elektrophorese der Niederschläge aus verschiedenen pH-Fällungen zeigten sich Banden, die nur in der Y-Bande mit der 30 Minuten-Referenz übereinstimmten. Das pH-Optimum wurde bezüglich der Niederschlagsmengen bei pH 5,6 bestimmt.

Nach Reduzierung der Proben mit MCA ergaben sich keine Anhaltspunkte, daß es sich hierbei um Derivate des Fibrinogens handelt (Abb. 4).

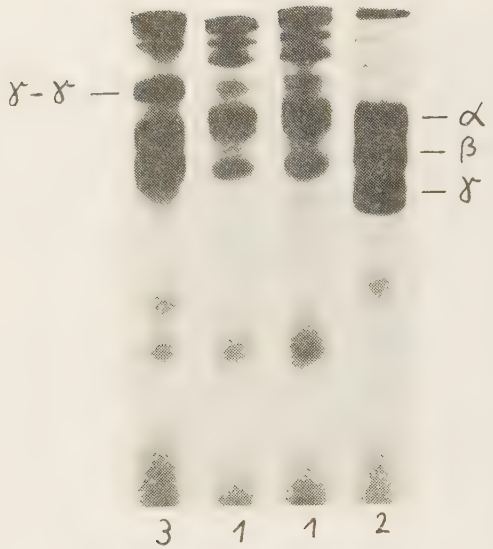


Abb. 4

SDS-PAGE (7,5 % Gel) von Säurepräzipitat (pH 5,6) aus Serum (nach Reduktion mit Merkaptoäthanol)

1 : Präzipitat aus Normalserum
2 : Referenz: Fibrinogen
3 : Referenz: Fibrin quervernetzt

In Abb. 4 sind keine typischen α -, ß-, γ -Banden zu erkennen. Falls die Fragmente X, Y und D vorhanden wären, wie man aus den nichtreduzierten Proben (Abb. 3) vermuten könnte, müßten auch die Banden der γ und ß''-Kette vorhanden sein, die hier aber fehlen.

Da der Ansatz der Euglobulinfällung der hier beschriebenen Säurefällung bezüglich pH-Wert und Verdünnungsfaktor ähnlich ist, kann geschlossen werden, daß es sich um Euglobulinfällungsprodukte handelt. Diese sind Faktor V, VIII, XII, XIII und andere Proteine (14).

4.3.2. Hitzepräzipitation von Fibrinogenspaltprodukten in Gegenwart von Normalserum

Nach Zugabe eines 30 Minuten-Abbaugemisches zu den zentrifugierten Ansätzen mit pH-Werten von 4,0 bis 6,0 erhielt man nach 1 Stunde im Eisbad Präzipitate, die in ihren Banden eindeutig dem X und Y entsprachen. (Abb. 5)

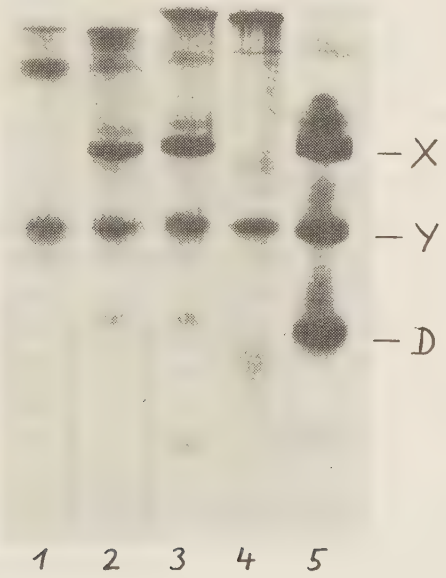


Abb. 5

SDS-PAGE (5 proz. Gel) von Säurepräzipitaten von 30 Min. Abbaugemischen aus Seren, die vor Zugabe der Abbaugemische auf pH Werte von 4 bis 6 eingestellt und zentrifugiert worden waren.

1: Präzipitat aus Normalserum + 30 Min. FAP : pH 6
2: Präzipitat aus Normalserum + 30 Min. FAP: pH 5,5
3: Präzipitat aus Normalserum + 30 Min. FAP : pH 5
4. Präzipitat aus Normalserum + 30 Min. FAP : pH 4,5
5. Referenz: 30 Min. FAP aus Fibrinogen (Kabi)

Bei pH 6 und pH 4,5 erhält man nur Y (Gel 1 und 4). Dagegen fällt bei pH 5 und 5,5 auch X gut aus (Gel 2 und 3). D wird schlecht präzipitiert. Es sei noch bemerkt, daß sich die Säurepräzipitate in Harnstoff oder TES-Puffer + Harnstoff nur schwer lösen.
Das pH Optimum ist nach Zugabe des 30 Minuten-Abbaugemisches nach pH 5 verschoben.

Weitere Versuche zeigten, daß späte Abbauprodukte bei noch niedrigerem pH optimal präzipitieren. Nun war zwar erwiesen, daß FAP in Gegenwart von Serum im sauren pH-Bereich und bei bestimmter Ionenstärke präzipitieren, da aber unter diesen Bedingungen offenbar Euglobulinfällungsprodukte mit ausfallen, ist die Methode nicht ausreichend spezifisch, um FAP aus dem Serum zu isolieren. Die hier durchgeführten Fällungen erfolgten nach Abtrennung der Euglobulinpräzipitate. Dadurch erscheinen die FAP-Banden ohne die verfälschenden Einflüsse der Euglobulinbanden relativ gut.

4.4. Säure-Hitze-Präzipitation

4.4.1. pH-Optimum bei der Säure-Hitze-Fällung

Zu 0,5 ml-Proben von Normalserum wurden jeweils 289 ug eines 30 Minuten-Fibrinogenabbaugemisches zugegeben, was einer Konzentration von 57,8 mg% entsprach. Nach Verdünnung mit Saline im Verhältnis 1 : 5 wurden pH-Werte zwischen 3,5 und 6,5 eingestellt und 10 Minunten auf 60°C erhitzt. Es zeigte sich bei pH 4,5 und 5,0 ein maximaler Niederschlag, während unter pH 4,0 kein Präzipitat auftrat (Abb. 6). Mit steigendem pH nahmen auch die Niederschlagsmengen wieder ab. Die Ausbeuten wurden nach Auflösen der Präzipitate in 0,5 ml TES-Puffer + Harnstoff

photometrisch bestimmt. Zu jeder Probe wurde ein Leerwert gemessen, d.h. das Normalserum wurde ohne FAP bei den betreffenden pH Werten ebenso behandelt, wie oben beschrieben. Die Niederschläge bei pH 4,5 und 5,0 erwiesen sich als schlecht zentrifugierbar, dennoch betrug die photometrische Ausbeutenbestimmung weit über 100 %, was auf Fremdproteine schließen läßt. Am optimalsten erschien uns die Abscheidung bei pH 5,6; der Niederschlag war gut zentrifugierbar und die Ausbeute betrug abzüglich des Leerwertes nahezu 100 %. Dies schließt nicht aus, daß auch unter diesen Bedingungen Fremdproteine abgeschieden werden.

4.4.2. Säure-Hitze-Präzipitation von FAP in Gegenwart von Normalplasma bzw. Normalserum

Da die bisherigen Versuchsergebnisse aus dem Serum FAP spezifisch zu isolieren unbefriedigend blieben, wurden die Hitze- und die Säurefällungsmethode kombiniert.
Nun wurden die mit Saline im Verhältnis 1:5 verdünnten Proben zum einen nur erhitzt und zum andern angesäuert und erhitzt. (Abb. 7)

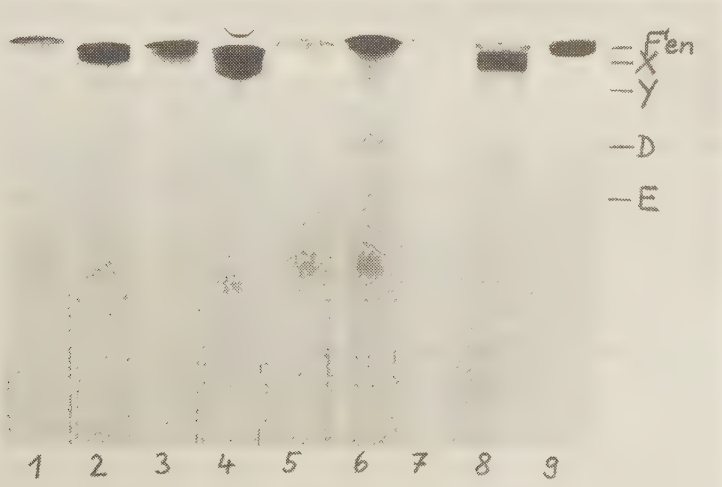


Abb. 7

SDS-PAGE (7,5 proz. Gel, nicht reduziert) von Hitzepräzipitaten (10',60°C) aus mit Saline verdünntem Normalplasma (0,2 ml + 1,0 ml Saline) versetzt mit Fibrinogenabbauprodukten (FAP) (je 0,1 ml, von 0,8 mg Fibrinogen stammend).

1: ohne FAP, nicht angesäuert
2: ohne FAP, pH 5,6
3: mit 20 Min. FAP, nicht angesäuert
4. mit 20 Min. FAP, pH 5,6
5: mit 60 Min. FAP, nicht angesäuert
6: mit 60 Min. FAP, pH 5,6
7: Normalserum, pH 5,6
8: Referenz: 20 Min. FAP
9: Referenz: Fibrinogen

Bei den Gelen 1 - 6 wurde der Ansatz mit Normalplasma vorbereitet. Beim Erhitzen von Plasma fällt sehr wenig aus. Neben der Fibrinogenbande existiert noch eine sehr schwache Bande, die unterhalb der Position von E erscheint und damit kleiner als E ist (Gel 1). Dagegen scheidet sich nach Ansäuern (pH 5,6) und Erhitzen 10', 60°C) deutlich mehr Fibrinogen neben etwas X ab (Gel 2).

Nach Zugabe von einem 20 Minuten-Abbaugemisch zu Normalplasma war nach Erhitzen im Vergleich zum Ansäuern/Erhitzen deutlich weniger FAP ausgefallen (Gel 3 und 4). In Gel 4 können Fibrinogen, Fragment X, Y und D eindeutig aufgrund der Referenzen identifiziert werden. Die späteren FAP (60 Min. mit FAP), die ebenfalls zu Normalplasma zugegeben wurden, präzipitieren nahezu spezifisch aus dem Plasmaansatz (Gel 6). Unterhalb der Position von E können etwas verwaschene Banden registriert werden, die den Peptiden A, B, C entsprechen könnten.

Dieselben Versuche wurden auch mit Serum durchgeführt (Abb. 8)

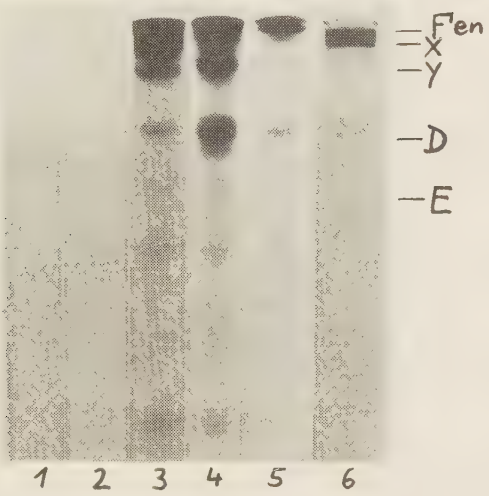


Abb. 8

SDS-PAGE (7,5 proz. Gel, nicht reduziert) von Hitzepräzipitaten (10', 60°C) von mit Saline verdünntem Normalserum (0,2 ml + 1,0 ml Saline) versetzt mit FAP (je 0,1 ml, von 0,8 mg Fibrinogen stammend).

1: ohne FAP, pH 5,6
2: mit 20 Min. FAP, nicht angesäuert
3: mit 20 Min. FAP, pH 5,6
4: mit 60 Min. FAP, pH 5,6
5: mit 60 Min. FAP, pH 5,6 (kleinere Auftragsmenge)
6: Referenz: 20 Min. FAP

Die FAP präzipitieren auch hier eindeutig und sind in TES-Puffer + Harnstoff gut löslich.
Neben den Banden der Fragmente X, Y, D und E tritt eine Bande mit einem höheren Molekulargewicht als X auf (Gel 3, 4 und 5). Dabei kann es sich um Aggregate der Fragmente handeln.

Die Versuche zeigen, daß unter diesen Verdünnungsbedingungen (1 Teil Plasma bzw. Serum auf 5 Teile physiologischer Kochsalzlösung) bei pH 5,6 und anschließendem 10-minütigen Erhitzen auf 60° C praktisch alle Fibrinogenderivate nebeneinander ausfallen. Da aus Serum allein ohne Zusatz von FAP keine Proteinbanden erhalten werden (Gel 1), können die nach Zusatz von FAP aus dem Präzipitat erhaltenen Banden eindeutig nur die Fibrinogenfragmente sein.
Es war auch von Interesse, ob nicht nur die in vitro zu Plasma bzw. Serum zugesetzten FAP unter Säure-Hitze-Bedingungen präzipitierten, sondern ob direkt im Plasma abgebautes Fibrinogen ebenfalls präzipitierbar ist. Bei dieser Gelegenheit wurde auch das für die klinische Diagnostik wichtige D-D in vitro hergestellt.
Die Abbildung 9 zeigt, daß das in vitro entstandene D-D unter den oben genannten Versuchsbedingungen präzipitierbar ist. Ebenso unterscheiden sich die aus Plasmafibrinogen gespaltenen FAP von den aus Fibrinogen Kabi stammenden FAP in ihrer Säure-Hitze-Präzipitierbarkeit im Prinzip nicht.

Der durch Streptokinase induzierte Plasminabbau des Fibrinogens erfolgt im Plasma offensichtlich langsamer als in plasmafreien Löasungen (vergl. Gel2b, mit 4b). Dieser Unterschied kann auf den Gehalt an Antiplasmin im Plasma beruhen.

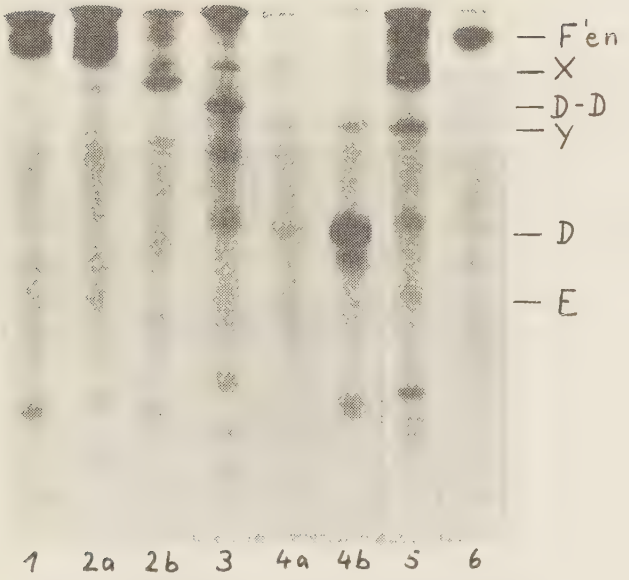


Abb. 9

SDS-PAGE (5 proz. Gel, nichtreduziert) von Hitzepräzipitaten (10', 60°C) von angesäuerten Proben (pH 5,6) von mit Saline verdünntem Normalplasma (0,2 ml + 1 ml Saline). Das Normalplasma wurde zuvor bei Proben 1-3 bei 37°C unverdünnt inkubiert, wie im Einzelnen angegeben.

1: ohne Streptokinase (SK)
2a: mit Streptokinase 5 Min.
2b: mit Streptokinase 60 Min.
3: mit SK plus Thrombin: es bildete sich ein Clot, der nach ca. 12 Min. gelöst war. Plasminaktivitat wurde durch Trasylol gestoppt (Ansatz führte zur Bildung von D-D)
4a: Referenz: 20 Min. FAP
4b: Referenz: 60 Min. FAP
5: Referenz: 20 Min. FAP zu Plasma zugesetzt und präzipitiert wie bei Gel 4, Abb. 7
6: Referenz: Fibrinogen

4.4.3. Empfindlichkeit der Säure-Hitze-Fällungsmethode

Da die Plasmakonzentration der FAP in vivo meistens sehr gering ist, - sie bewegt sich zwischen 1 - 8 mg% -, wurde das beschriebene Verfahren auf Empfindlichkeit untersucht. Zu je 0,5 ml Normalserum, mit 2,5 ml Saline verdünnt, wurden verschiedene Mengen eines 30 Minuten Abbaugemisches zugegeben, anschließend säure-hitze-präzipitiert und die Ausbeuten photometrisch bestimmt.

Tab. 2

Ausbeute an FAP in Prozent der zugesetzten Menge aus Serum durch Säure-Hitzefällung bei pH 5,6 (nach Abzug des Leerwertes)

Zugegebene Menge 30 Min. FAP zu je 0,5 ml N-Serum	in mg%	Ausbeute nach S.-H.-Präzipitation	Ausbeute minus Leerwert	in %
341 ug	68,5	561 ug	498 ug	145
202 ug	40,5	355 ug	292 ug	145
101 ug	20,2	161 ug	98 ug	97
60 ug	12,0	78,5 ug	15,5 ug	25
41 ug	8,2	78,5 ug	15,5 ug	38
0 ug	0,0	63,0 ug	0,0 ug	0

Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß bei hohen Konzentrationen die Ausbeute weit über 100 % liegt, dagegen bei den niedrigen Konzentrationen auch die Ausbeute gering bleibt. Offenbar werden bei hohen FAP-Konzentrationen mehr Fremdproteine während des Präzipitationsvorgangs mitgerissen.

Trotz der geringen Ausbeuten bei niedrigen FAP-Konzentrationen sind die FAP in der Elektrophorese mit entsprechend großen Auftragsmengen einwandfrei darzustellen und zu identifizieren. Die aus den Empfindlichkeitsmessungen postulierten Fremdproteine stören die Elektrophorese auch hier im Wanderungsgeschwindigkeitsbereich der Fibrinogenderivate nicht (Abb. 10).

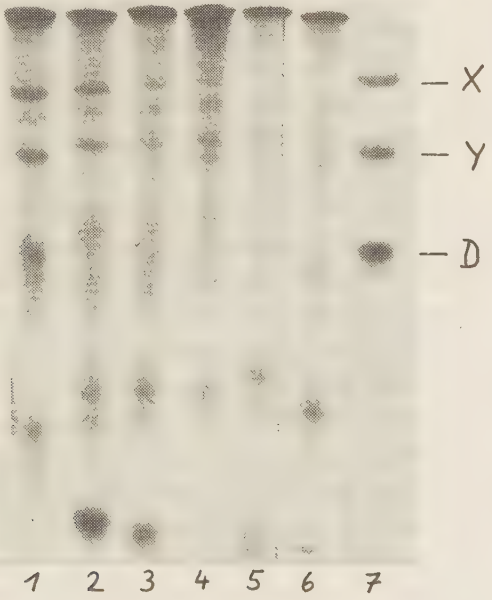


Abb. 10

SDS-PAGE (5 proz. Gel, nicht reduziert) von Normalplasmaproben (0,5 ml verdünnt mit 2,5 ml Saline) nach Ansäuern (pH 5,6) und Hitzepräzipitation (10', 60°C). Den Plasmaproben wurde zuvor 30 Min. FAP in unterschiedlicher Menge (gemessen als Fibrinogenäquivalent) zugesetzt (s. Tab. 2).

1: 341 ug FAP
2: 202 ug FAP
3: 101 ug FAP
4: 60 ug FAP
5: 41 ug FAP
6: 0 ug FAP
7: Referenz 30 Min. FAP

5. Diskussion

Eine einfache und spezifische Methode zum Nachweis der Fibrinogenabbauprodukte im Serum oder Plasma war das Ziel meiner Untersuchungen.
Die Fibrinogenbestimmung mittels Hitzefällung nach Schulz et al. (42) wird längst als Routinemethode in der Praxis angewendet. Nach Beller und Maki (3) sollen bei dieser Methode, wobei Plasma 10 Minuten auf 56°C erhitzt wird, auch FAP falls vorhanden mitausfallen, wodurch zu hohe Werte für Fibrinogen vorgetäuscht werden sollen.
Marder und Shulman (35) konnten die Hitzepräzipitierbarkeit (30 Min., 56°C) der Fibrinogenabbauprodukte X, Y und D aus reinen Lösungen zeigen. Die nähere Untersuchung dieses Verfahrens zeigte, daß bei 60°C die Abscheidung der Fibrinogenfragmente X, Y und D schon durch 10minütiges Erwärmen mit guter Ausbeute erfolgt.
Fragment E und die kleineren α -Kettenfragmente A B und C sind dagegen nicht präzipitierbar.
Noch bessere Ausbeuten werden erreicht, wenn die Lösungen vor oder nach dem Erhitzen schwach angesäuert werden. In Gegenwart von Serum oder Plasma konnte durch bloßes Erhitzen auf 60°C keine Abscheidung der Fragmente beobachtet werden. Aus Plasma war sogar nur eine schwache Fibrinogenbande neben einer Albuminbande erkennbar.
Deutlich bessere Ergebnisse erzielte man wiederum nach Ansäuern mit Salzsäure.
Daraufhin wurde das Präzipitationsverhalten der FAP im sauren Bereich in Gegenwart von Serum untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß Normalserum ohne FAP, welches zuvor mit aqua auf das zehnfache Volumen verdünnt wurde,

nach Ansäuern mit 0,1 N HCl auf pH-Werte von 4,5 bis 6,0 Präzipitate bildete, die sich bei elektrophoretischer Auftrennung (Abb. 3) als aus einer Vielzahl von Proteinen bestehend, erwiesen. Darunter waren auch den Fibrinogenfragmenten Y und evtl. D entsprechende Banden, die aber im Normalserum eigentlich nicht in diesem Ausmaß vorhanden sein dürften. Die Untersuchung der reduzierten Proben ließ dann auch aus der Abwesenheit der charakteristischen Untereinheiten z.B. dem Fehlen der γ-Ketten, darauf schließen, daß es sich bei den fraglichen Proteinbanden nicht um Fibrinogenderivate handelte (Abb. 4). Das Abscheidungsoptimum wurde zu pH 5,6 bestimmt. Die ähnlichen Versuchsbedingungen bei der Euglobulinfällung drängten uns zu der Annahme, daß es sich hier um deren Produkte handelte. Die Säurepräzipitierbarkeit der FAP in Gegenwart von Serum erwies sich jedoch als gut, nachdem die Serumproben von der Euglobulinfällung befreit worden waren. Damit war gezeigt, daß sich die FAP durch Ansäuern aus Serum abscheiden lassen, jedoch zumindest mit diesem Versuchsansatz wegen des Mitausfallens anderer Proteine die Methode nicht spezifisch genug war.

Die kombinierte Säure-Hitze-Fällung der FAP in Serum bzw. Plasma brachte dann weit bessere Ergebnisse. Die Methode wurde allerdings dahingehend variiert, daß die Plasma- bzw. Serumproben anstelle von Wasser mit Saline im Verhältnis 1:5 verdünnt wurden. Auffallend war, daß nach 10minütigem Erhitzen der Plasmaprobe auf 60°C keine Ausflockung erfolgte. Wurde dagegen auf pH 5,6 angesäuert, fiel nach anschließendem Erhitzen Protein aus, das praktisch nur aus Fibrinogen besteht und keine Fremdproteine enthält. Auch nach Zusatz von Fibrinogenspaltprodukten können diese mit der Säure-Hitze-Methode ausgefällt und

da keine Fremdproteine stören, einwandfrei identifiziert werden (Abb. 7).
Dieselbe eindeutige Präzipitierbarkeit der FAP konnte auch mit Serum im Versuchsansatz erzielt werden (Abb. 8).
Schließlich konnte gezeigt werden, daß man Fibrinogen- und Fibrinspaltprodukte mit dieser Methode nachweisen kann, wenn man diese vorher durch Induzierung einer Fibrinogenolyse mit Streptokinase bzw. einer Fibrinolyse durch Thrombin und Streptokinase erzeugt hat (Abb. 9). Da bei letzterer Reaktion auch das quervernetzte Fragment D-D entsteht, das ebenfalls elektrophoretisch identifiziert werden konnte, ist die Säure-Hitze-Präzipitation als besonders einfache und schnelle Methode zur Isolierung von FFAP aus Serum oder Plasma anzusehen.

Einschränkend muß gesagt werden, daß bei Empfindlichkeitsmessungen (Tab. 2) die geforderte Bedingung der Ansprechbarkeit auf geringste Konzentrationen von 1 mg% nicht erfüllt wird.
Obwohl die Säure-Hitze-Präzipitation bei in vitro vorbereiteten Fibrin-Fibrinogen Abbauprodukten gute Ergebnisse zeigte, so muß doch darauf hingewiesen werden, daß bei Anwendung dieser Methode auf Seren von Patienten im Zustand einer progredienten Hyperkoagulabilität mit Aktivierung der Fibrinolyse, sich bisher nicht der gewünschte Erfolg einstellte.
Dabei lag die Schwierigkeit wiederum in der Unspezifität der Präzipitation und damit in der Interpretation der elektrophoretischen Auftrennung. Diese bestehende Unzulänglichkeit bleibt somit Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Fibrinogen und die Fibrinogenabbauprodukte X, Y und D lassen sich aus Lösungen die frei von anderen Proteinen sind, durch Erwärmen auf 60°C (5-10 Min.) mit hoher Ausbeute abscheiden. Fragment E und die kleineren Kettenbruchstücke wie A, B und C sind dagegen nicht hitzepräzipitierbar. In Gegenwart von Serumproteinen lassen sich erst aus schwach angesäuerten Proben durch Erhitzen die Fragmente X, Y und D abscheiden. Das pH-Optimum liegt bei ca. 5,6. In diesem pH-Bereich präzipitieren nach Verdünnen der Proben von Normalserum mit aqua auf das Zehnfache leider auch andere Serumproteine. Nach Abtrennen der Fremdproteine erweist sich die Säurepräzipitierbarkeit der Fibrinogenabbauprodukte in Gegenwart von Serum als gut.

Die Fällbarkeit der FAP in Gegenwart von Serumproteinen nach Ansäuern und nachfolgendem Erhitzen erweist sich bei einer Verdünnung der Proben mit Saline auf das Fünffache als gut. Die Spezifität für Fibrinogen und seine Spaltprodukte ist im Gegensatz zum Versuchsansatz mit aqua deutlich höher. Die geforderte Empfindlichkeit der Säure-Hitze-Fällung von 1 mg% Fibrinogen konnte bislang nicht erfüllt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Albrechtsen, O.K. (1959):
Fibrinolytic activity in the organisme.
Acta Physiol. Scand. 47, Suppl. 165

2. Alkjaersig, N., Fletcher, A.P., Sherry, S. (1958):
The activation of human plasminogen.
J. Biol. Chem. 233: 86-90

3. Beller, F.K., Maki, M. (1971):
Differentiation between intravascular coagulation
and intravasal proteolysis. In: Thrombosis and
Bleeding Disorders, N.K. Bang and F.K. Beller (Hrsg.)
Academic Press, New York-London

4. Blombäck, B., Blombäck, M., Henschen, A., Hessel, B.
Iwanaga, S., Woods, K.R. (1968):
N-terminal disulfide knot of human fibrinogen.
Nature 218: 130-134

5. Blombäck, B., Hogg, D.H., Gardlund, B., Hessel, B.,
Kudryk, B. (1976):
Fibrinogen and fibrin formation.
Thrombosis Research Suppl. II, 329-346

6. Blombäck, B., Blombäck, M. (1972):
The molecular structure of fibrinogen.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 202: 77-97.

7. Blombäck, B., Blomböck, M. (1957):
Purification of human and bovine fibrinogen.
Ark. Kemi 10:415-443

8. Collen, D., Kudryk, B., Hessel, B., Blombäck, B. (1975):
Primary structure of human fibrinogen and fibrin.
J. Biol. Chem. 250:5808-5817

9. Das, P.C., Allan, A.G.E., Woodfield, D.G., Cash, J.D. (1967):
Fibrin degradation products in sera of normal subjects.
British Med. J. 4:718

10. Ferguson, E.W., Fretto, L.J., and Mc Kee P.A. (1975):
A reexamination of the cleavage of fibrinogen and fibrin
by plasmin.
J. Biol. Chem. 250:7210

11. Furlan, M., Beck, E.A. (1972):
Plasmic degradation of human fibrinogen.
I. Strctural characterization of degradation products.
Biochem. Biophys. Acta 263: 631

12. Furlan, M., Seelich, Th., Beck, E.A. (1975):
Plasmic degradation of human fibrinogen.
IV. Identification of subunit chain remants in fragment Y.
Biochem. Biophy. Acta 400:112

13. Gaffney, P.J. (1975):
Distinction between fibrinogen and fibrin degradation products in plasma.
Clin. Chim. Acta 65:109

14. Gaffney, P.J. (1971):
Heterogeneity of human fibrinogen.
Nature 230:54

15. Gaffney, P.J., Lane, D.A., Kakkar, V.V., Brasher, M. (1975):
Characterisation of a soluble D dimer-E complex in cross-linked fibrin digests.
Thrombosis Research 7:89

16. Graeff, H., Beller, F.K.
Fibrinolytic activity in whole blood, dilute blood, and englobulin clot lysis time tests.
In: Thrombosis and Bleeding Disorders, N.K. Band and F.K. Beller (Hrsg.)
Academic Press, New-York-London

17. Graeff, H., von Hugo, R. (1972):
Identification of fibrinogen derivates in plasma samples.
Thromb. Diath. haemorrh. 27:10

18. Graeff, H., Hafter, R., von Hugo, R. (1978):
Akute Blutgerinnungsstörung in der Geburtshilfe.
Med. Welt 29:212-216

19. Hedner, U., Nilsson, J.M. (1971):
Clinical experience with determination of fibrinogen degradation products.
Acta Med. Scand. 189:471

20. Hafter, R., von Hugo, R., Graeff, H. (1978):
Acid precipitation of fibrinogen: a technique for isolation of fibrinogen and its derivatives from highly diluted solutions.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359:759-763

21. Hafter, R., Graeff, H. (1976):
Estimation of soluble fibrin monomer complexes by agarose gel filtration.
In: Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol. 2. J.F. Davidson, M.M. Samama and P.C. Desnoyers (Hrsg.)
Raven Press, New York, pp 137-149

22. Hafter, R. Schneebauer, T., Tafel, K. Ernst, E., Graeff, H. (1975):
Bestimmung von löslichen Fibrinmonomerkomplexen zur Erfassung der Hyperkoagulabilität in der Schwangerschaft und unter der Geburt.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 35:518-525

23. Haverkate, F., Timan, G. (1977):
Protective effect of calcium in the plasmin degradation of fibrinogen and fibrin fragments D.
Thrombosis Research 10:803

24. von Hugo, R., Graeff, H. (1973):
Formation of soluble fibrin monomer complexes in human plasma.
Thrombosis Research 3:183

25. Hörmann, H., Gollwitzer, R. (1966):
Analytische Untersuchungen über Rinderfibrinogen und -fibrin
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 346:21

26. Hörmann, H. (1975):
A subfraction of fragment D isolated from a plasmin hydrolysate of human fibrinogen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356:1947-1953

27. Kanaide, H., Shainoff, J.R. (1975):
Crosslinking of fibrinogen and fibrin by fibrin-stabilizing factor (factor XIIIa)
J. Lab. Clin. Med. 85:574

28. Kopec, M., et al. (1973):
Studies on the "Double D" fragment from stabilized bovine fibrin.
Thromb. Research 2:253-291

29. Kuhn, W., Graeff, H. (1977):
In: Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe.
Thieme Verlag, Stuttgart

30. Laki, K., Lorand, L. (1948):
On the solubility of fibrin clot.
Science 108, 280

31. Lane, D.A., Scully, M.F., Kakkar, V.V. (1976):
A method for characterising serum fibrinogen and fibrin degradation products.
Thromb. Research 9:191

32. Marder, V.J., Shulman, N.R. (1969):
High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin.
I. Physicochemical and immunological characterization.
J. Biol. Chem. 244: 2111

33. Merskey, C., Kleiner, G.J., Johnson, A.J. (1966):
Quantitiative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnosis and treatment.
Blood 28:1

34. Mihalyi, E. (1953):
Transformation of fibrinogen into fibrin.
I. Electrochemical investigation of the activation process.
J. Biol. Chem. 209:723

35. Mills, D., Karpatkin, S. (1970):
Heterogenity of human fibrinogen: Possible relation to proteolysis by the thrombin and plasmin as studied by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochem. Biophys. Res. Com. 40:206

36. Nanninga, L.B. (1977):
Soluble fibrin complexes in early fibrin digests.
Thrombos. Haemostas. 37:192

37. Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L., McKee, P.A. (1972):
The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen.
J. Biol. Chem. 247:636

38. Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L., McKee, P.A. (1973):
The effect of plasmin on the subunit structure of human fibri
J. Biol. Chem. 248:4574

39. Pizzo, S.V., Schwartz, M.L., Hill, R.L. McKee, P.A. (1973):
Subunit structure of fragment D from fibrinogen and cross-linked fibrin.
J. Biol. Chem. 248:4584

40. Test-Fibel Blutgerinnung: Staphylokokken-Clumping-Test.
Informationsschrift von Boehringer Mannheim (1975)

41. Weber, K., Osborn, M. (1975):
Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures.
In: The Proteins, Vol. 1, H. Neurath, R.L. Hill, C.L. Boeder (Hrsg.)
Academic Press, New York, S. 180

42. Schulz, F.H. (1955):
Hitzefällbarkeit von Fibrinogen.
Acta Hematologica 3:306

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Graeff für die Überlassung und Betreuung meiner Arbeit.
Ebenso danke ich Herrn Dr. Hafter, der mir bei allen Problemen im Labor, insbesondere bei der Ausarbeitung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand.
Für die geduldige Mithilfe und Unterstützung bei praktischen Aufgaben schulde ich Frl. von Brunn Dank.

Lebenslauf

1950	geboren in Traunstein
1956 - 1961	Besuch der Volksschule in Vachendorf Landkreis Traunstein
1961 - 1970	Besuch des Chiemgaugymnasiums Traunstein
1970	Abitur
1970 - 1972	Maschinenbaustudium an der TU München
1972 - 1974	Studium für das Realschullehramt, Fächerverbindung "Physik/Chemie" an der LMU München
1974	Fachliche Prüfung für das Lehramt an Realschulen
1975 - 1981	Medizinstudium an der LMU München
1976	Ärztliche Vorprüfung
1977	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1980	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1981	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung